



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

지방유래 줄기세포에서 분화된
연골세포가 방사선 처리된 연골에
미치는 영향

2018년 2월

서울대학교 대학원

의학과 성형외과학전공

최 순 우

요약 (국문 초록)

대중적으로 이루어지고 있는 비성형술은 비배부나 비침의 피하에 이식을 시행하는 경우가 많은데, 자가연골이 부족한 경우 방사선 처리된 동종 늑연골을 사용하기도 한다. 하지만 동종 늑연골도 장기간의 추적 관찰연구에 따르면 감염, 흡수, 휘어짐 등의 부작용이 발생할 수 있다고 되어있다. 본 저자는 방사선 처리된 동종 늑연골의 하나인 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 처리하고 연골 신생을 유도하여 실험동물에 이식한 후 신생 연골이 유지되는지, 합병증은 발생하지 않는지 확인하고자 하였다.

인체에서 유래한 지방유래 줄기세포를 이용하여 *in vitro* 환경에서 연골세포로 분화시켰다. Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 분주하고 표면에 부착되는지 전자현미경으로 확인한 후 확립된 연골분화의 방법으로 연골 신생을 유도하였다. Tutoplast® 연골군, Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포 처리 후 분화 없이 배양한 미분화 연골군, Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포 처리 후 연골분화를 유도한 분화 연골군으로 나누어 누드마우스의 옆구리 피하에 이식을 시행하였다. 수술 2, 4주 후 연골을 채취하여 육안적, 조직학적 및 유전자발현 분석을 시행하고, 연골의 정성평가를 위해 변형된 International Cartilage Research Society (ICRS) 등급 척도를 이용하였다.

지방유래 줄기세포를 2차원적 및 3차원적으로 배양하여 연골세포로 분화시킨 결과 연골 신생이 일어남을 Alcian blue 염색과 COL2A1 유전자발현을 통해 확인할 수 있었다. Tutoplast® 연골에 분주한 지방유래 줄기세포는 연골 표면에 부착되고 연골세포로의 분화가 가능함을 전자현미경 관찰로 확인하였다. 누드마우스에 이식한 세 군의 Tutoplast® 연골 중 분화 연골군에서 육안 및 조직학적 소견상 신생 연골이 유지됨을 확인할 수 있었고 연골 특이적 유전자의 발현도 다른 군에 비해 높았다. 이식술 후 창상감염, 연골노출, 실험동물 폐사 등의 합병증은 없었다.

Tutoplast® 연골이 지방유래 줄기세포의 스캐폴드로 작용할 수 있고, 신생된 연골이 실험동물 체내에서 유지됨을 확인할 수 있었다. 따라서 연골이 필요한 치료에 있어서 방사선 처리된 동종 늑연골을 보다 안정적으로 사용할 수 있는 실험적 근거를 제공하였다는데 이번 연구

에 의의가 있다고 할 수 있겠다.

주요어: 비성형술, 동종이식, 줄기세포, 연골 신생
학번: 2011-30581

목차

1. 서론	1
1.1 이상적인 이식물질의 조건.....	1
1.2 자가연골의 사용과 한계.....	1
1.3 방사선 처리된 동종 늑연골의 도입.....	2
1.4 방사선 처리된 동종 늑연골로서의 Tutoplast®.....	4
1.5 방사선 처리된 동종 늑연골의 한계.....	4
2. 연구 목적	6
3. 재료 및 방법	8
3.1 지방유래 줄기세포의 획득 및 배양.....	8
3.2 지방유래 줄기세포의 연골세포로의 분화.....	9
3.3 동종 늑연골에 지방유래 줄기세포의 처리.....	9
3.4 실험동물 모델 및 연골이식술.....	11
3.5 조직학적 분석.....	14
3.6 유전자발현 분석.....	14
3.7 전자현미경 분석.....	18
3.8 통계학적 분석.....	18
4. 결과	19
4.1 지방유래 줄기세포의 확립 및 배양.....	19
4.2 연골세포로의 분화.....	19
4.3 지방유래 줄기세포를 처리한 동종 늑연골의 분석.....	24
4.4 이식한 동종 늑연골의 분석.....	28
4.4.1 육안적 관찰.....	28
4.4.2 조직학적 분석.....	33

4.4.3 유전자발현 분석.....	33
5. 고찰.....	39
6. 결론.....	44
7. 참고문헌.....	45

List of Figure

Figure 1. Experimental scheme depicting <i>in vitro</i> culture of adipose-derived stem cell (ADSC) on Tutoplast® cartilage..	10
Figure 2. Transplantation surgery of Tutoplast® cartilage in nude mice.....	12
Figure 3. Experimental scheme depicting <i>in vivo</i> transplantation of adipose-derived stem cell (ADSC)-seeded Tutoplast® cartilage	13
Figure 4. Culture of adipose-derived stem cell (ADSC) with either culture media or chondrogenic differentiation media for 2 weeks.....	20
Figure 5. Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell (ADSC).....	21
Figure 6. 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell (ADSC).....	22
Figure 7. Gross observation of <i>in vitro</i> constructs after 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell...	23
Figure 8. Stained images of <i>in vitro</i> construct after 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell...	25
Figure 9. Quantitative real-time PCR analysis of <i>COL2A1</i> between control and chondrogenic differentiation groups.....	26
Figure 10. Images of scanning electron microscope of Tutoplast® cartilage surface.....	27
Figure 11. Gross observations of nude mouse having transplantation	

surgery of Tutoplast [®] cartilage at postoperative week 4....	29
Figure 12. Gross observation of transplanted Tutoplast [®] cartilages at postoperative week 4.....	30
Figure 13. Gross observation of chondrogenic differentiated adipose-derived stem cell on Tutoplast [®] cartilage (ADSC-TC) at postoperative week	31
Figure 14. Gross morphology and histological scores for chondrogenesis based on international cartilage repair society scoring system.....	32
Figure 15. Images of hematoxylin & eosin (H&E) staining of Tutoplast [®] cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC at postoperative week 4.....	34
Figure 16. Images of Safranin O staining of Tutoplast [®] cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC at postoperative week 4.....	35
Figure 17. Quantitative real-time PCR analysis of <i>COL1A2</i> , <i>COL2A1</i> , <i>COL10A1</i> and <i>ACAN</i> at postoperative week 2.....	37
Figure 18. Quantitative real-time PCR analysis of <i>COL1A2</i> , <i>COL2A1</i> , <i>COL10A1</i> and <i>ACAN</i> at postoperative week 4.....	38

List of Table

Table 1. International Cartilage Repair Society - Gross morphology scoring system.....	15
Table 2. International Cartilage Repair Society - Histological scoring system (modified).....	16
Table 3. Primer sequences for quantitative real-time PCR.....	17

서론

1. 이상적인 이식물질의 조건

낮은 비배부 및 비침 모양 개선을 위한 비성형술은 대중적으로 이루어지는 미용수술 중 하나이다. 수술의 내용상 비배부나 비침의 피하에 이식을 시행하여야 하는데, 이를 위해 생물학적 조직이나 인공보형물과 같은 다양한 종류의 이식물질을 사용해왔다. North 등에 의하면 이상적인 이식물질은 다음과 같은 조건을 지녀야 한다.¹

- 1) 공여부에서 상당한 통증이 수반되는 수술 없이 쉽게 얻을 수 있어야 한다.
- 2) 수혜부 조직과의 적합성을 보여야 한다.
- 3) 피부나 점막 조직과 가까운 부위에 이식되어도 천공을 일으키거나 노출되지 않아야 한다.
- 4) 현저한 변형을 일으키지 않아야 한다.
- 5) 장기간 관찰시에도 흡수되지 않아야 한다.

2. 자가연골의 사용과 한계

비성형술의 초창기에는 소에서 유래한 뼈나 연골을 이용한 이종이식이 시행되기도 하였으나 상당한 염증반응과 흡수로 더 이상 사용되지 않았다. 한편, 인공보형물의 경우 공여부가 필요 없고, 간편하게 이식물질을 사용할 수 있다는 장점이 있으나 감염, 구축 등의 문제가 발

생활 수 있다. 따라서 그동안 임상에서 자가연골을 이식물질로 사용해 왔으며, 비중격 연골, 귀 연골, 늑연골, 근막 등을 이용한 다양한 비성형술이 시행되어왔다.

이 중에서 흔히 사용하는 자가연골인 비중격 연골은 조직의 공여부와 수혜부가 같은 수술 범위에 있어 공여부에 대한 추가적인 절개가 필요하지 않기 때문에 환자의 회복이 빠르다는 장점이 있다. 연골이 비교적 두툼하지만 유연하기 때문에 비연골 구조의 지지체로서 적절하다. 하지만 일차적으로 사용되는 연골이므로 재수술의 경우 채취할 수 있는 연골의 양이 부족할 수 있다. 귀 연골의 경우 비침에 대한 수술 시 유용하게 사용되나 연골의 모양에 굴곡이 있기 때문에 쓰임이 제한적이다.^{2,3} 늑연골은 충분한 양의 이식물질을 얻을 수 있으나, 연골이 단단하고, 공여부에 반흔을 남기며, 술후 통증, 기흉, 혈흉 등의 합병증이 있을 수 있다.^{4,5} 그리고 나이가 많은 환자의 경우 늑연골에 석회화가 진행되어 채취하고 조각하는데 어려움이 따를 수 있다.

3. 방사선 처리된 동종 늑연골의 도입

인공보형물과 자가연골의 장점을 취하고 단점을 보완할 수 있는 대안으로 방사선 처리된 동종 늑연골 (irradiated allogeneic costal cartilage, IACC, 이하 동종 늑연골)이 있다. 1940년 O'Connor와 Pierce가 늑연골을 merthiolate에 담가 냉장고에 보관하였다는 보고가 동종 늑연골 사용의 효시가 된다.⁶ 1941년 Straith와 Slaughter가 보관하던 동종 늑연골을 이용하여 100례의 안면윤곽술을 성공적으로 시행하였다는 보고를 하였으며,⁷ 이후 Dingman과 Grabb은 턱과 안와부에 시행한 600예 이상의 동종 늑연골 이식술에서 좋은 성과를 보였다고

발표하였다.⁸

전술한 대로 방사선 처리된 동종 늑연골은 인공보형물이 가진 장점과 마찬가지로 공여부가 필요 없으며, 자가연골에 비해 많은 양의 연골을 얻기가 쉽다. 게다가 인공보형물의 단점인 감염의 가능성이 낮아 피부를 통한 노출 가능성도 떨어진다. 이는 낮은 면역성으로 인해 수혜부에서 거부반응을 일으킬 가능성이 줄어드는 연골조직 특유의 속성에 기인한다.⁹ 이식물질로 사용할 연골은 주로 25세 이하의 젊은 기증자로부터 획득하기 때문에 석회화의 가능성이 낮다. 그리고 전신 질환이나 감염질환의 여부, 약물사용력 등을 확인하기 때문에 이식물질로 인한 질병의 전파 가능성도 사전에 차단할 수 있다. 이러한 조건을 갖춘 늑연골조직은 30~50 kGy의 감마선조사로 방사선 처리하고 생리식염수에 담겨 보관된다.

연골조직은 연골세포, 수분, 프로테오글라이칸으로 이루어지는데 프로테오글라이칸은 제2형 콜라겐 섬유를 포함한다.¹⁰ 연골의 면역성은 주로 연골세포의 표면에서 발현하는데 감마선조사로 면역성을 제거할 수 있다.¹¹ 감마선조사는 늑연골을 단단하게 만들 수 있지만, 한편으로 연골의 흡수를 억제하는 효과도 있다.¹² 1977년 Schuller 등은 방사선 처리된 동종 늑연골을 이용하여 안면윤곽술을 시행하였는데 3년 이상 경과 관찰한 결과 연골의 흡수율은 1.4%에 불과했다고 발표하였다.¹³ 하지만 이후에 평균 9년의 관찰 기간을 갖고 동종 늑연골을 살펴본 결과 무려 75%의 흡수율을 보여 동종 늑연골의 흡수율에 대해 논란이 있어왔다.

이후 1993년에 Kridel과 Konior는 비성형술에 방사선 처리된 동종 늑연골을 사용하고 최대 7년간 추적 관찰한 결과 일부 감염, 흡수 소견을 보였지만 대부분 양호한 상태를 보였고 피부 밖으로 노출된 증

례는 없었다고 발표하였다.¹⁴ 이 발표 이후 다양한 증례에서 동종 늑연골을 사용하여왔다. 비슷한 맥락으로 Lefkovits 등은 비중격 연골이 부족한 경우 비배부에 대한 비성형술에 있어서 방사선 처리된 동종 늑연골은 이상적인 이식물질로 간주할 수 있다고 주장하기도 하였다.¹⁵

4. 방사선 처리된 동종 늑연골로서의 Tutoplast[®]

동종 늑연골은 점차 그 안정성이 인정되어, 미국 식품의약안전청을 포함한 다수의 국제의약품 관리기관의 승인을 받았으며, 현재 전 세계적으로 다양한 회사의 제품들이 시판되고 있다. 그중 대표적인 제품 중 하나인 Tutoplast[®]-processed costal cartilage (Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, 독일, 이하 Tutoplast[®] 연골)는 삼투 및 17.8~25.0 kGy의 감마선조사를 통해 조직의 세포 및 각종 병원균, 바이러스 등을 제거하였다. 생체적합성과 구조적 완결성이 높아 관절의 연골손상 등의 치료에 사용이 가능하다.

5. 방사선 처리된 동종 늑연골의 한계

상품화된 동종 늑연골이 보편적으로 사용되고 있지만, 무균화 및 면역성 제거를 위한 공정을 통해 완벽한 연골조직을 얻는 것은 사실상 불가능하다. 게다가 이러한 처리 과정이 연골의 생화학적 및 물리적 성상에 안 좋은 영향을 준다고 알려져 있다. 실제 임상에서 염증 및 감염이 발생하는 사례가 없지 않으며 기증자의 나이, 신체 상태에 따라 연골에 질적인 차이가 존재할 수 있다.

2003년에 Demirkan 등은 65예의 비성형술에 Tutoplast® 연골을 사용하였는데 평균 33개월의 관찰 기간 동안 눈에 떨어진 흡수 등의 부작용은 발견할 수 없었다고 보고하였다.¹⁶ Tosun 등도 비성형술을 시행함에 있어서 22명의 환자에서는 자가연골을, 19명의 환자에서는 Tutoplast® 연골을 사용하였는데 10년간의 경과 관찰상 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었다는 논문을 발표하였다.¹⁷ 한편 Song 등은 Tutoplast® 연골을 이용하여 35예의 비성형술을 시행하였는데, 17%에서 흡수를, 9%에서는 연골의 휘어짐을, 3%에서는 연골의 골절이 일어남을 보고하였다.¹⁸ 각 연구마다 수술 방법, 경과 관찰 기간, 연구 대상자 등에서 차이를 보인다는 점을 감안하였을 때 Tutoplast® 연골의 효용성에 대해서 어느 한쪽으로 결론을 내리기는 어렵다. 따라서 방사선 처리된 동종 늑연골의 안정적인 사용을 위해 추가적인 연구가 필요한 상황이다.

연구 목적

비성형술에 있어서 방사선 처리된 동종 늑연골의 활용도는 점차 증가하고 있다. 자가연골을 사용하는 것에 비해 수술 및 회복 시간이 단축되며, 공여부의 이환을 피할 수 있고, 여러 번의 재수술로 자가연골을 사용하기 힘든 환자에서 일차적으로 사용을 고려하게 된다. 하지만 전술한 대로 장기간의 추적 관찰 결과가 연구를 통해 완전하게 입증된 상태가 아니므로, 감염, 흡수, 휘어짐 등의 부작용이 발생할 수 있다.

동종 늑연골의 안정적인 임상 적용을 위해 줄기세포를 접목한 이식술은 하나의 좋은 대안이 될 수 있다. 이미 다양한 생물학적 이식물질이 스캐폴드의 역할을 하여 줄기세포와 동반 상승효과를 낸다는 연구결과는 이미 여러 차례 보고된 바 있다.¹⁹ 연골에 대해서도 생물학적 이식물질을 스캐폴드삼아 줄기세포를 부착하면 특정 환경 안에서 연골세포로 분화시킬 수 있음이 Cheng 등에 의해 소개된 바 있다.²⁰

연골은 뼈나 근육과는 달리 체내에 존재하는 조직의 양이 한정적이기 때문에 미용 혹은 재건수술시 충분한 양을 얻는 것이 쉽지 않다. 따라서 방사선 처리된 동종 늑연골에 줄기세포를 접목하여 안정적인 이식술이 가능해진다면, 연골이 필요한 미용수술은 물론이고, 소이증과 같은 선천성 기형, 연골손상이 동반된 외상 후 재건과 같이, 연골이 필요한 환자의 치료에 큰 도움이 될 수 있으리라 본다. 따라서 이번 연구는 대표적으로 사용하고 있는 Tutoplast[®] 연골이 지방유래 줄기세포의 스캐폴드 역할을 수행하여 줄기세포의 생착 및 분열은 물론 더 나아가 연골로 분화가 가능한 지 확인하는 것이다. 방사선 처리된 동종 늑연골의 연구 중에서 Tutoplast[®] 연골이 지방유래 줄기세포의

스캐폴드로 작용하는 것은 물론 연골세포로의 분화를 유도할 수 있음을 밝힌 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 이번 연구를 통해 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 처리하여 보다 안정적인 연골 제공을 통해 비성형술 뿐만 아니라 연골이 필요한 모든 치료에 적용할 수 있는 실험적 근거를 마련하는데 의의가 있다고 할 수 있겠다.

재료 및 방법

1. 지방유래 줄기세포의 획득 및 배양

이번 연구에 필요한 사람의 지방조직은 서울대학교병원의 의학 연구 윤리심의위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 사전 승인을 받고 진행하였다 (IRB No. H-1605-058-761). 건강한 20~40대의 여성 3명에게서 획득한 지방조직을 가위로 잘게 조각내어 0.2% collagenase (Worthington Biochemical Corporation, 미국)가 포함되어있는 Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich, 미국)에 담아 37℃에서 30분간 교반하여 분해시켰다. Collagenase의 효소작용을 중지시킨 후 40- μ m cell strainer (BD Biosciences, 미국)로 불순물을 걸러내고 5분간 470 \times g의 속도로 원심분리를 하였다. 상층의 지방세포 등을 걷어내고 바닥에 가라앉은 혈관기질분획 (Stromal Vascular Fraction, SVF) 세포들을 획득하였다.^{21,22}

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 10%의 태아소혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS)과 1%의 페니실린/스트렙토마이신이 혼합된 세포배양 media에 혈관기질분획 세포를 풀어 37℃ 및 5% 이산화탄소 환경의 incubator에서 배양하였다. 혈관기질분획 획득 상태를 지방유래 줄기세포의 passage 0으로 간주하였다. 3일 간격으로 계대배양을 시행하였으며, 이번 연구에 사용한 지방유래 줄기세포는 passage 3에서 7 사이의 세포들이었다.

2. 지방유래 줄기세포의 연골세포로의 분화

Culture dish 혹은 15 ml tube의 바닥에 지방유래 줄기세포를 모으고, 연골 신생 media (DMEM, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.1mM ascorbic acid 2-phosphate, 40 mg/ml L-hydroxyproline, 100 nM dexamethasone, 10 ng/ml transforming growth factor- β 1 (TGF β 1), 25 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), ITS (10 mg/ml insulin, 5.5 mg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium), 0.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) and 4.7 mg/ml linoleic acid)를 분주하여 2주간 배양을 하였다.²³⁻²⁵ Media는 3일에 한번씩 교체를 하였다.

3. 동종 늑연골에 지방유래 줄기세포의 처리

사체에서 얻어 방사선 처리를 한 동종 늑연골인 Tutoplast[®] 연골을 가로 5 mm, 세로 5 mm, 두께 2 mm로 준비하여 100만 개의 지방유래 줄기세포를 연골 위에 분주하였다 (Fig. 1). 37°C 및 5% 이산화탄소 환경의 incubator에서 연골이 마르지 않도록 media를 조금씩 뿌려가며 연골 위의 줄기세포를 배양한 후 총 2시간이 경과하여 줄기세포가 연골과 유착되었다고 판단되면 연골을 media에 담가 2주간 배양을 하였다. 지방유래 줄기세포를 연골세포로 분화시킬 목적의 연골은 연골 신생 media에, 미분화 연골은 연골세포로의 분화 없이 세포배양 media로 배양하였다.

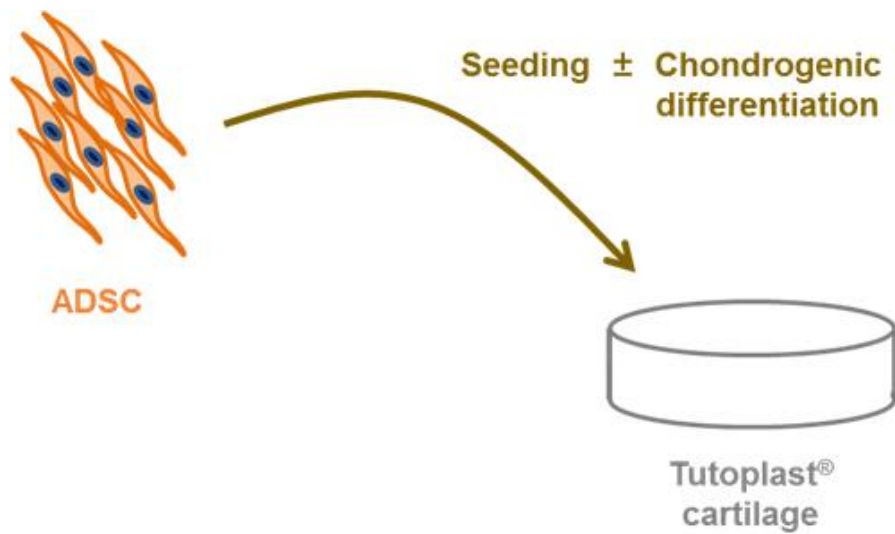


Figure 1. Experimental scheme depicting *in vitro* culture of adipose-derived stem cell (ADSC) on Tutoplast® cartilage. Seeded cells were cultured with either culture media or chondrogenic differentiation media for 2 weeks.

4. 실험동물 모델 및 연골이식술

동물실험은 서울대학교병원 전임상실험부의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) 사전 승인을 얻고 진행하였다 (IACUC No. 16-0081-C1A0). 실험동물로 체중 20 g 전후의 생후 6주령의 수컷 Balb-c nude mouse를 사용하였다. 이식수술을 위한 마취를 위해 ketamine (휴온스㈜, 대한민국) 100 mg/kg와 xylazine (Rompun; 한국바이엘㈜, 대한민국) 10 mg/kg을 각각 근육 내로 주사하였다.

마취 후 실험동물이 진정상태가 되면 우측 등을 소독하고 척추와 평행하게 1.5 cm 가량 절개를 가하였다 (Fig. 2). 우측 옆구리를 박리하여 연골이 들어갈만한 공간을 충분히 확보한 후 연골을 이식하였다. 실험동물은 총 3개의 군으로 나뉘는데, 1군은 대조군으로서 지방유래 줄기세포의 처리 없이 Tutoplast® 연골만 이식한 군이며 (Tutoplast® cartilage, TC), 2군은 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 분주하여 2주간 분화 없이 배양한 미분화 연골군이고 (Undifferentiated ADSC-TC, UA-TC), 3군은 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 분주하여 2주간 연골 신생 media에서 연골분화를 유도한 분화 연골군이었다 (Chondrogenic differentiated ADSC-TC, CA-TC) (Fig. 3). 절개창은 봉합하여 연골이 노출되지 않도록 하였다. 수술 후 창상감염을 예방하기 위해 cefazolin 20 mg/kg을 한차례 근육 내 주사하였다.

수술 2, 4주 후 실험동물을 마취한 후 이산화탄소를 이용하여 안락사시켰다. 연골을 채취하여 조직학적 및 유전자발현 분석을 시행하였다.

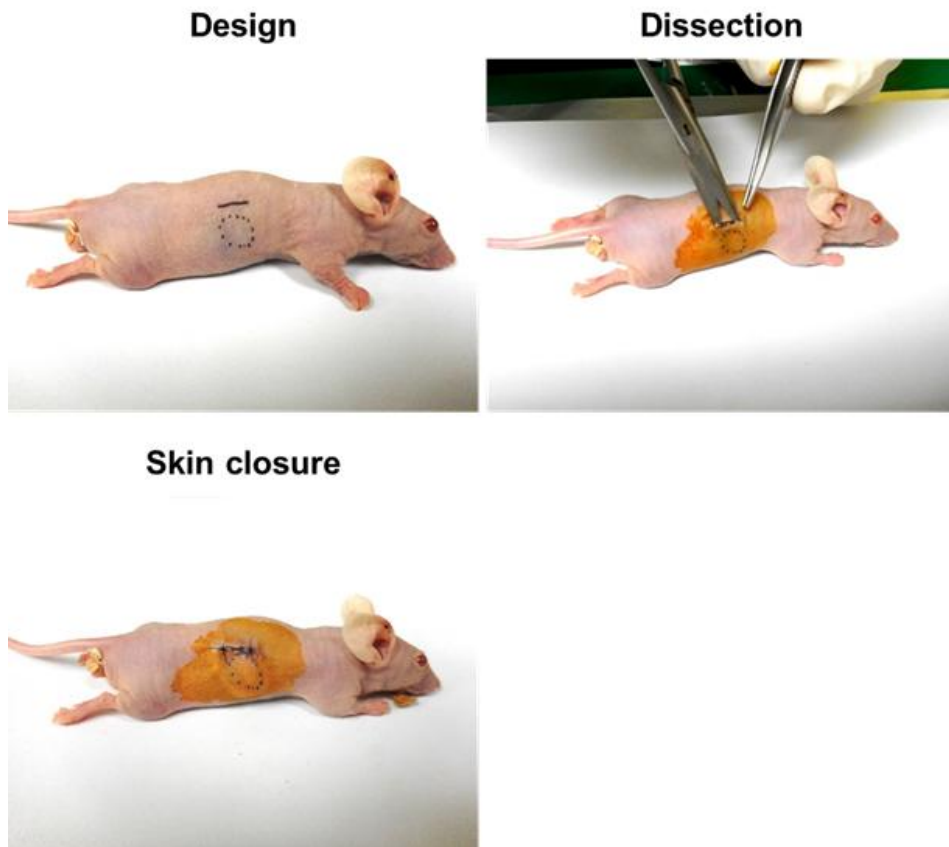


Figure 2. Transplantation surgery of Tutoplast[®] cartilage in nude mice. 1.5cm-sized incision was made at right flank. After subcutaneous dissection, cartilage was inserted to the subcutaneous pocket. Incisional wound was closed by skin sutures.

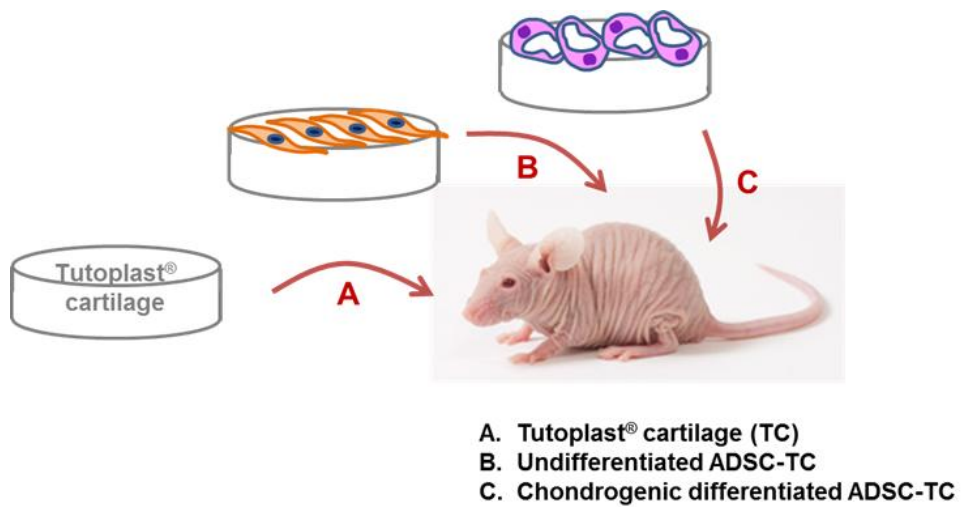


Figure 3. Experimental scheme depicting *in vivo* transplantation of adipose-derived stem cell (ADSC)-seeded Tutoplast® cartilage. One of Tutoplast® cartilage (TC, A), undifferentiated ADSC-TC (B) or chondrogenic differentiated ADSC-TC (C) was transplanted in the subcutaneous plane of nude mouse.

5. 조직학적 분석

시험관 내 (*in vitro*) 배양으로 얻은 조직 또는 실험동물에서 획득한 연골을 4% paraformaldehyde에 24시간 고정시켰다. 이후 파라핀으로 포매를 하여 파라핀 블록을 만들고 4 μm 의 두께로 절편으로 슬라이드를 만들어 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 연골 신생을 확인하기 위해서 Alcian blue 및 Safranin O 염색을 시행하였다. 염색된 슬라이드는 Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Biosystems, 독일)를 이용하여 촬영하였다.

신생 연골의 정성평가를 위해 변형된 International Cartilage Research Society (ICRS) 등급 척도를 이용하였다 (Table 1 and 2).²⁶ 형태학적 분석은 4가지 분류로, 조직학적 분석은 5가지 분류로 나뉘어 각 항목마다 점수를 매기는 방식으로, 형태학적 분석은 0~8점, 조직학적 분석은 0~14점의 총점이 산출된다.

6. 유전자발현 분석

시험관 내 배양을 한 세포 또는 실험동물에서 획득한 연골에서 RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 독일)을 이용하여 RNA를 추출하였다. GoScript Reverse Transcription Kit (Promega, 미국)로 역전사를 통해 cDNA를 합성하였고, LightCycler® 480 System (Roche, 스위스) 장비를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 시행하였다. 이번 연구에서는 연골 특이 유전자로 알려진 COL1A2, COL2A1, COL10A1 및 ACAN에 대해 분석하였고, RT-PCR에 사용한 각 유전자의 primer

Table 1. International Cartilage Repair Society

- Gross morphology scoring system

Description	Points
1. Edge integration (new tissue relative to native cartilage)	
1) Full	2
2) Partial	1
3) None	0
2. Smoothness of the cartilage surface	
1) Smooth	2
2) Intermediate	1
3) Rough	0
3. Cartilage surface, degree of filling	
1) Flush	2
2) Slight depression	1
3) Depressed/overgrown	0
4. Translucency of the neo-cartilage	
1) Slight depression	2
2) Transparent	1
3) Opaque	0

Table 2. International Cartilage Repair Society

- Histological scoring system (modified)

Description	Points
1. Cell morphology	
1) Hyaline cartilage	0
2) Mostly hyaline cartilage	1
3) Mostly fibrocartilage	2
4) Mostly non-cartilage	3
5) Non-cartilage only	4
2. Matrix staining (metachromasia)	
1) Normal	0
2) Slightly reduced	1
3) Markedly reduced	2
4) No metachromatic stain	3
3. Surface regularity	
1) Smooth ($> 3/4$)	0
2) Moderate ($> 1/2 \sim 3/4$)	1
3) Irregular ($1/4 \sim 1/2$)	2
4) Severely irregular ($< 1/4$)	3
4. Thickness of cartilage	
1) $> 2/3$	0
2) $1/3 \sim 2/3$	1
3) $< 1/3$	2
5. Integration of donor with host adjacent cartilage	
1) Both edges integrated	0
2) One edge integrated	1
3) Neither edge integrated	2

Table 3. Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene		Sequences
<i>ACAN</i>	Forward	5'-AGAACAGTGCCATCATTGCCACGC-3'
	Reverse	5'-GTTGGTGTCTCGGATGCCATACG-3'
<i>ACTB</i>	Forward	5'-AGAAGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	Reverse	5'-CGGATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
<i>COL1A2</i>	Forward	5'-CAGGCAGAGATGGTGAAGATGGTC-3'
	Reverse	5'-CAGGTCCTTGGAACCTTGAGG-3'
<i>COL2A1</i>	Forward	5'-CAGGCAGAGGCAGGAACTAAC-3'
	Reverse	5'-CAGAGGTGTTTGACACGGAGTAG-3'
<i>COL10A1</i>	Forward	5'-CGCTGAACGATACCAAATGCCCCAC-3'
	Reverse	5'-TTTCCCTACAGCTGATGGTCCCG-3'

정보는 Table 3에 정리하였다.²⁷ 각 유전자의 상대값은 housekeeping 유전자인 *ACTB*와의 비율로 계산하였다.

7. 전자현미경 분석

Tutoplast[®] 연골에 분주한 지방유래 줄기세포의 형태를 확인하기 위해 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope, SEM)을 이용하여 Tutoplast[®] 연골의 표면을 관찰하였다. 이를 위해 연골을 다음과 같이 처리하였다. 지방유래 줄기세포 배양 처리한 연골의 고정은 2.5% glutaraldehyde로 시행하였다. 0.1M Phosphate Buffered Saline (PBS)으로 세척을 하고 OsO₄에서 1시간 반 동안 postfixation을 하였다. 이후 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% 에탄올에서 각각 10분간 탈수를 하고 hexamethyldisilazane (HMDS)으로 10분간 처리한 후 건조시켰다. 시료대에 부착하여 이온 코팅을 하고 주사전자현미경 (JSM-7401; JEOL, 일본)으로 Tutoplast[®] 연골의 표면을 관찰하고 촬영하였다.

8. 통계학적 분석

측정치는 평균 \pm 표준오차의 형태로 표현하였다. 두군 또는 세군의 평균에 유의한 차이가 있는지 확인하기 위해 각각 Student's t-test 및 분산분석 (Analysis of variance, ANOVA)을 시행하였다. P-value가 0.05보다 작은 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다. IBM SPSS Statistics software 버전 22 (IBM Corp., 미국)를 이용하여 통계분석을 시행하였다.

결과

1. 지방유래 줄기세포의 확립 및 배양

인체에서 획득한 지방조직을 토대로 혈관기질분획을 추출한 후 이의 배양을 통해 지방유래 줄기세포를 확립하였다. Passage 3의 지방유래 줄기세포는 육안상 섬유모세포와 구분이 되지 않았으며 1주 이상 배양하면 culture dish를 가득 채울 정도로 높은 분열능을 보였다 (Fig. 4). 하지만 세포배양 media와 연골 신생 media로 키운 것에는 차이를 보였다. 세포배양 media로 키운 지방유래 줄기세포는 분열능이 높은 반면, 연골 신생 media로 분화시킨 지방유래 줄기세포는 분열능이 낮고 세포의 모양도 방추형의 섬유모세포와는 다르게 굽직한 편이었다.

2. 연골세포로의 분화

지방유래 줄기세포를 culture dish를 이용한 2차원적 배양뿐만 아니라 tube를 이용한 3차원적 배양으로도 연골세포로의 분화를 시도하였다. 2차원적 배양은 지방유래 줄기세포가 dish에 가득 찬 후 연골 신생 media로 3주간 배양하는 것으로 시행하였다. Alcian blue 염색을 통해 파랗게 염색되는 연골세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). Tube를 이용한 3차원적 배양은 지방유래 줄기세포를 이용하여 세포배양 media와 연골 신생 media로 각각 시행하였는데 연골 신생 media로 키운 지방유래 줄기세포는 둥근 구형대의 조직이 형성됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6 and 7). 조직에 대한 염색을 시행한 결과 Alcian blue

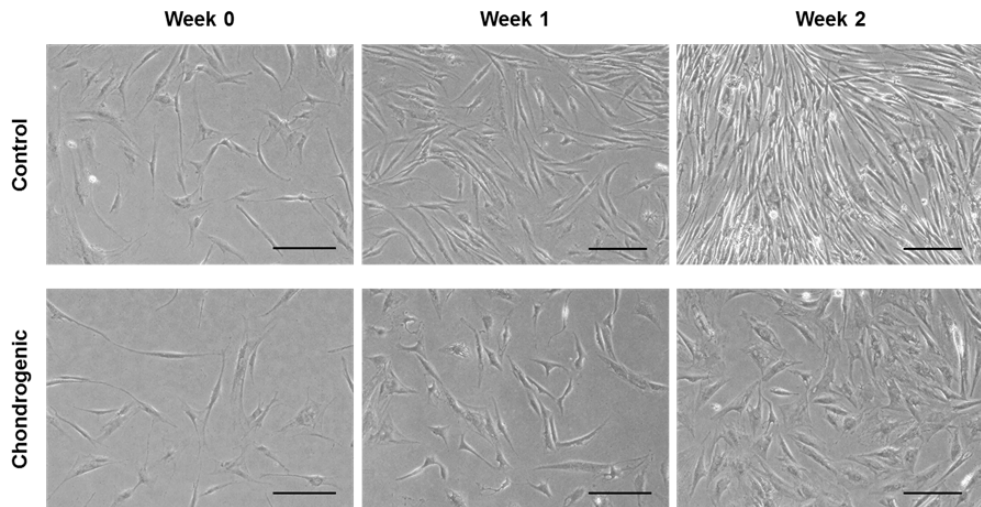


Figure 4. Culture of adipose-derived stem cell (ADSC) with either culture media or chondrogenic differentiation media for 2 weeks. The cell morphology and the rate of cell proliferation were different between control and chondrogenic differentiation groups. Scale bars = 200 μ m.

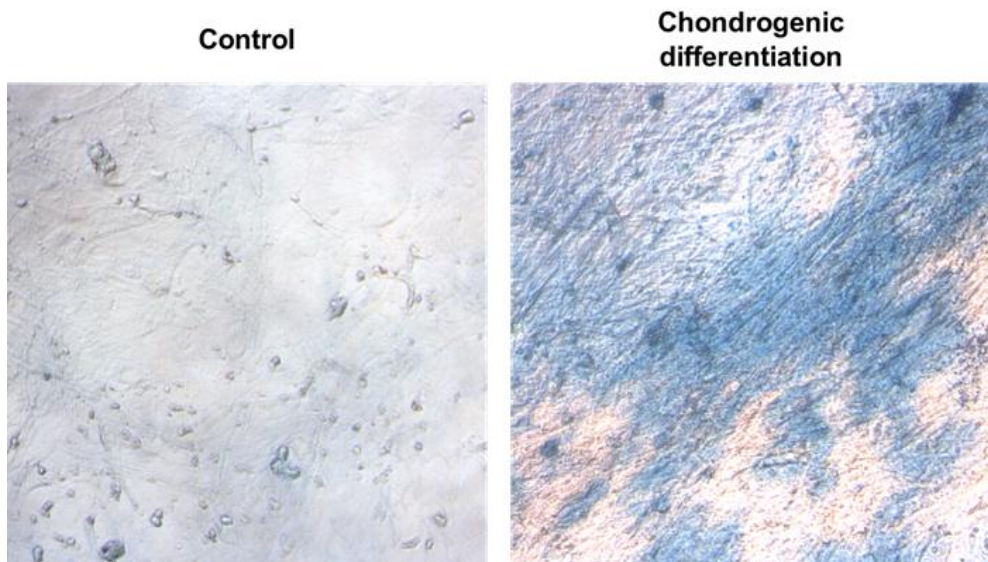


Figure 5. Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell (ADSC). ADSCs were cultured with either culture media or chondrogenic differentiation media for 3 weeks. Differentiated ADSCs were stained with Alcian blue method.

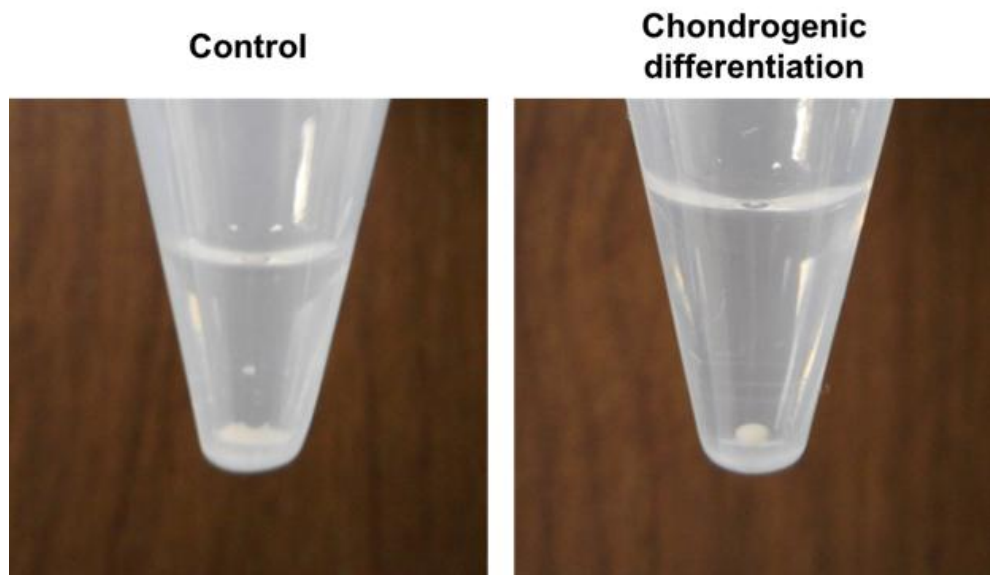


Figure 6. 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell (ADSC). ADSCs were cultured at the tip of tube with either culture media or chondrogenic differentiation media for 2 weeks.

Chondrogenic differentiation

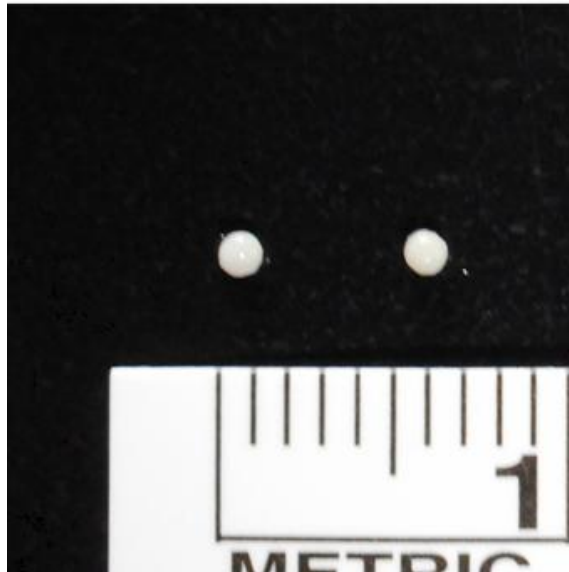


Figure 7. Gross observation of *in vitro* constructs after 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell.

염색에 양성을 보이는 세포들이 관찰됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 조직에 대한 유전자발현을 확인한 결과 연골 신생 media에서 배양한 조직이 세포배양 media에서 배양한 조직보다 COL2A1 유전자가 12배 가량 높게 발현하였다 (Fig. 9). 이를 통해 지방유래 줄기세포를 이용하여 2차원적 그리고 3차원적 배양을 통해 연골세포로의 분화가 가능함을 확인할 수 있었다.

3. 지방유래 줄기세포를 처리한 동종 늑연골의 분석

동종 늑연골인 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포의 배양이 가능한 scaffold로서 역할을 할 수 있는지 실험을 진행하였다. 100만 개의 지방유래 줄기세포가 올라간 동종 늑연골에 2주간 각각 세포배양 media와 연골 신생 media로 배양 및 분화를 시행하였고 이에 대한 확인을 위해 주사전자현미경으로 늑연골의 표면을 관찰하였다 (Fig. 10).

현미경상 세포를 올리지 않은 대조군의 동종 늑연골 표면에는 세포의 형상이 보이지 않았으며, 비교적 매끈하였다. 한편 연골분화 없이 지방유래 줄기세포를 분주한 미분화 연골군의 늑연골 표면에는 길쭉한 돌기를 가진 납작한 모양의 세포들이 군데군데 관찰되었다. 늑연골에 지방유래 줄기세포를 분주하여 연골 신생 media에서 연골분화를 유도한 분화 연골군은 동그란 구 형태의 연골세포들이 다수 관찰되었다. 이를 통해 Tutoplast® 동종 늑연골은 지방유래 줄기세포의 배양이 가능하며, 연골 위에 배양된 지방유래 줄기세포는 연골 신생 media 속에서 연골세포로의 분화도 가능함을 확인할 수 있었다.

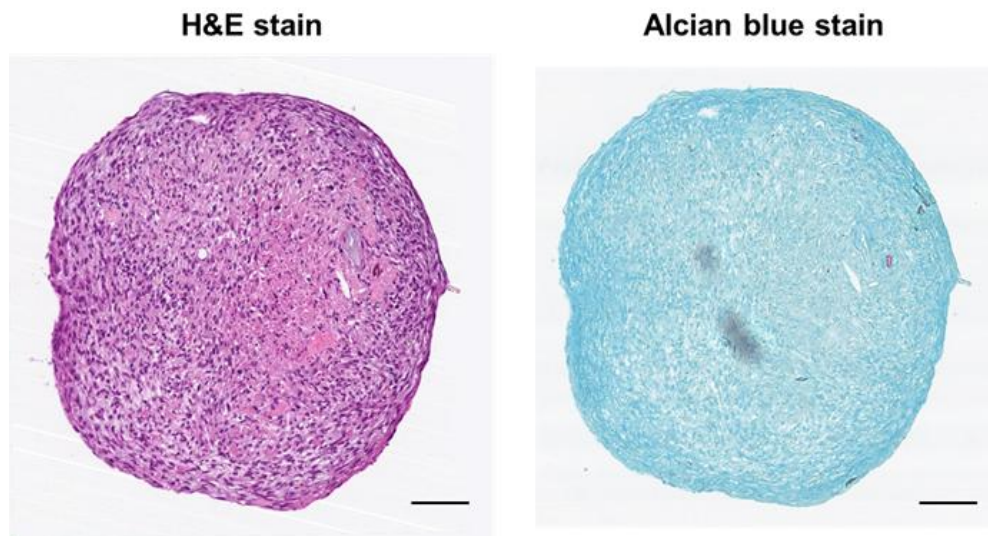


Figure 8. Stained images of *in vitro* construct after 3-dimensional chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cell. The construct was stained both hematoxylin & eosin (H&E) and Alcian blue staining. Scale bars = 200 μm .

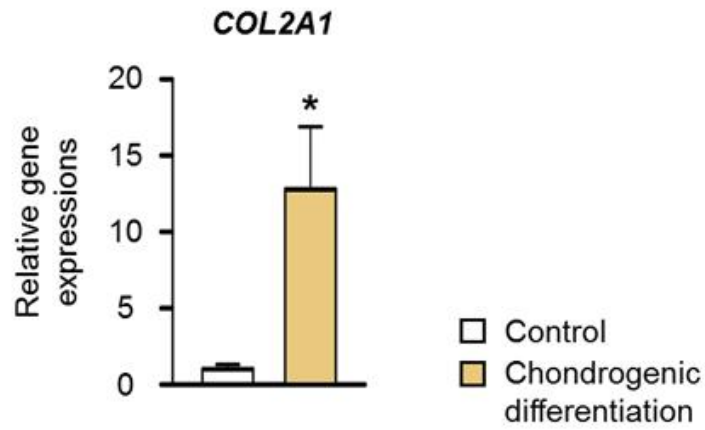


Figure 9. Quantitative real-time PCR analysis of *COL2A1* between control and chondrogenic differentiation groups. $n = 4$ per group.

*, $p < 0.05$ versus control group.

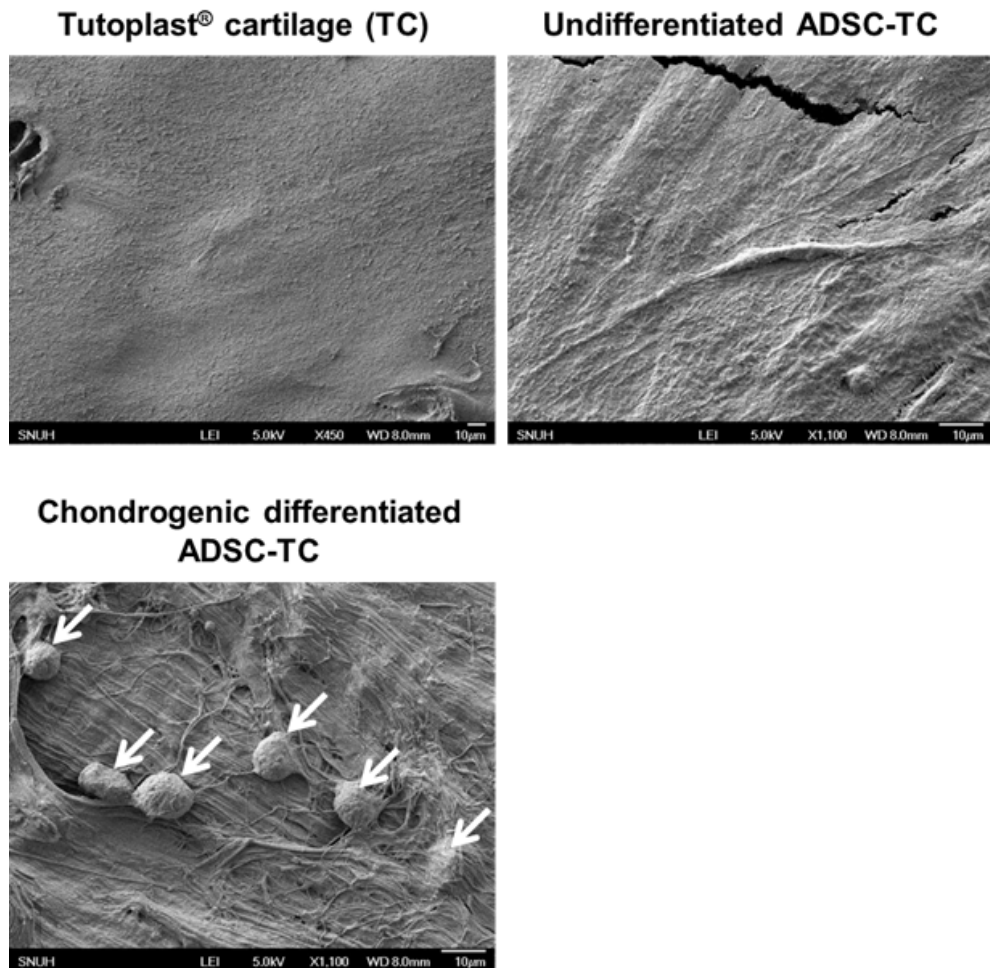


Figure 10. Images of scanning electron microscope of Tutoplast® cartilage surface. Adipose-derived stem cells (ADSC) were seeded and cultured on cartilage with either culture media or chondrogenic differentiation media. Differentiated chondrocytes (arrows) were identified on the surface of chondrogenic differentiated ADSC-Tutoplast® cartilage (ADSC-TC).

4. 이식한 동종 늑연골의 분석

2주간 지방유래 줄기세포를 처리하거나 처리하지 않은 동종 늑연골을 실험동물에 이식하고 수술 2, 4주 후에 연골을 다시 채취하여 분석을 시행하였다. 수술 후 관찰 기간 동안 창상감염, 연골노출, 실험동물 폐사 등의 합병증은 없었다.

1) 육안적 관찰

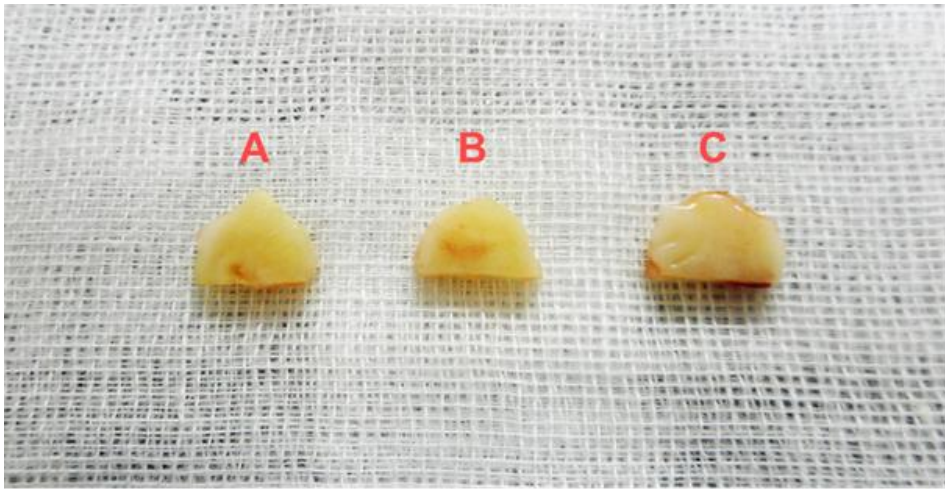
실험동물 옆구리 피하에 이식한 늑연골은 관찰 기간 동안 위치 변화 없이 제자리에서 유지되었다. 수술 2, 4주 후 실험동물을 안락사시켜 피부를 절개하여 늑연골을 확인한 결과 이식할 당시의 형태로 온전하게 실험동물의 피하에 유지되고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 11). 지방유래 줄기세포를 올린 늑연골의 표면이 피부밑에 위치하도록 이식하였는데 조직 채취시 늑연골과 피부가 유착되어 있었다. 유착된 피부를 늑연골로부터 분리시키면서 처리한 지방유래 줄기세포가 떨어져 나가지 않도록 주의를 가하였다.

수술 4주 후 채취한 대조군, 미분화 연골군, 분화 연골군의 동종 늑연골을 비교한 결과 다른 두 군과는 달리 분화 연골군의 표면은 매끈하지만 굴곡이 있어 기존의 동종 늑연골에 새로운 조직이 붙어있음을 시사하는 소견을 보였다 (Fig. 12 and 13).

세 군의 연골 신생에 대해 변형된 ICRS 등급 척도를 이용하여 형태학적 분석을 시행하였다 (Fig. 14). 대조군과 미분화 연골군의 등급은 큰 차이를 보이지 않았지만, 분화 연골군의 등급은 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 높음을 확인할 수 있었다.



Figure 11. Gross observations of nude mouse having transplantation surgery of Tutoplast[®] cartilage at postoperative week 4. Transplanted cartilage (arrow) was attached to the inside of the skin.



- A. Tutoplast® cartilage (TC)
- B. Undifferentiated ADSC-TC
- C. Chondrogenic differentiated ADSC-TC

Figure 12. Gross observation of transplanted Tutoplast® cartilages at postoperative week 4.

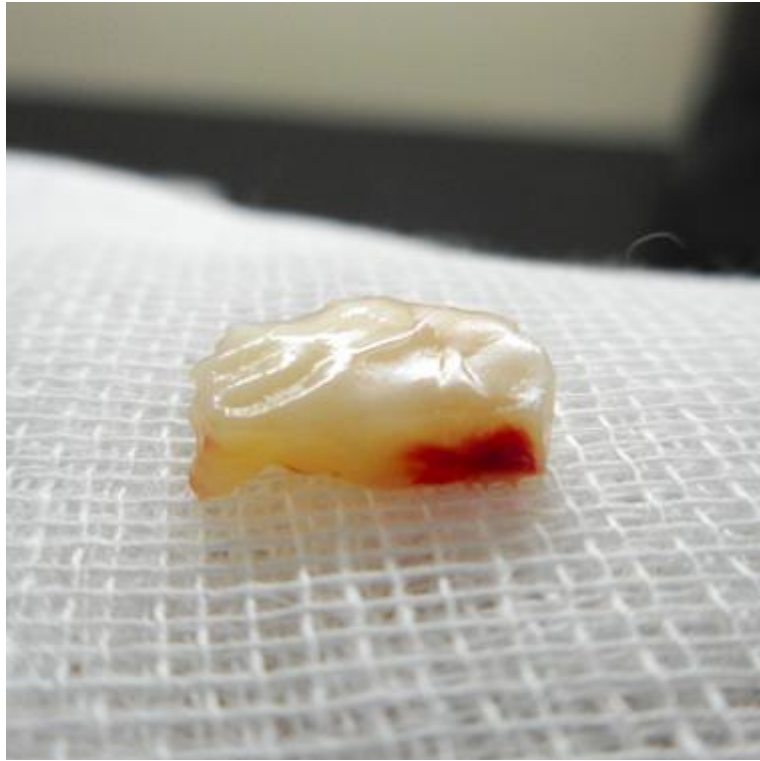


Figure 13. Gross observation of chondrogenic differentiated adipose-derived stem cell on Tutoplast[®] cartilage (ADSC-TC) at postoperative week 4.

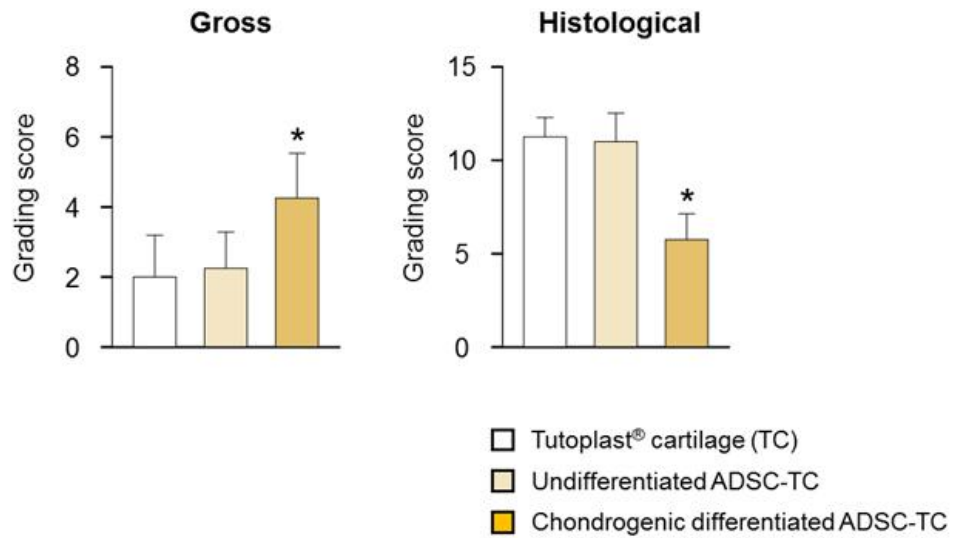


Figure 14. Gross morphology and histological scores for chondrogenesis based on international cartilage repair society scoring system. ADSC, adipose-derived stem cell. TC, Tutoplast® cartilage. *, $p < 0.05$ versus both Tutoplast® cartilage and undifferentiated ADSC-TC groups.

2) 조직학적 분석

수술 4주 후 채취한 세 군의 동종 늑연골에 대해 H&E 및 Safranin O 염색을 시행하였다. H&E 염색상 지방유래 줄기세포를 처리하지 않은 대조군의 늑연골 표면은 2-3겹의 세포층으로 덮여있는 반면, 미분화 연골군의 늑연골 표면은 6-7겹 이상의 두꺼운 세포층으로 덮여 있었다 (Fig. 15). 한편, 분화 연골군의 늑연골 표면은 일부 세포층이 관찰되기는 하지만 상당 부분은 기존의 동종 늑연골과 구분되기 어려운 표면 상태를 보이고 있었다.

Safranin O 염색상 대조군과 미분화 연골군의 소견은 H&E 염색에서 관찰한 소견과 크게 다르지 않았다 (Fig. 16). 하지만 분화 연골군의 늑연골은 염색의 정도가 진한 기존의 늑연골과 염색의 정도가 옅은 신생 연골로 구분됨을 확인할 수 있었다.

세 군의 연골 신생에 대해 변형된 ICRS 등급 척도를 이용하여 조직학적 분석을 시행하였다 (Fig. 14). 대조군과 미분화 연골군의 등급은 10등급 이상으로 두 군간에 큰 차이를 보이지 않았지만, 분화 연골군의 등급은 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 낮음을 확인할 수 있었다.

3) 유전자발현 분석

수술 2, 4주 후 채취한 세 군의 동종 늑연골에 대해 연골특이적 유전자에 대한 발현을 비교 분석하였다. 수술 2주후 채취한 조직에 대해서 COL1A2의 발현은 대조군, 미분화 연골군, 분화 연골군으로 갈수록 높게 나왔지만 유의한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 17). 그러나 COL2A1은 미분화 연골군과 분화 연골군의 수치가 대조군의 수치보다 통계학적으로 유의하게 높았다. 분화 연골군의 발현이 가장 높았

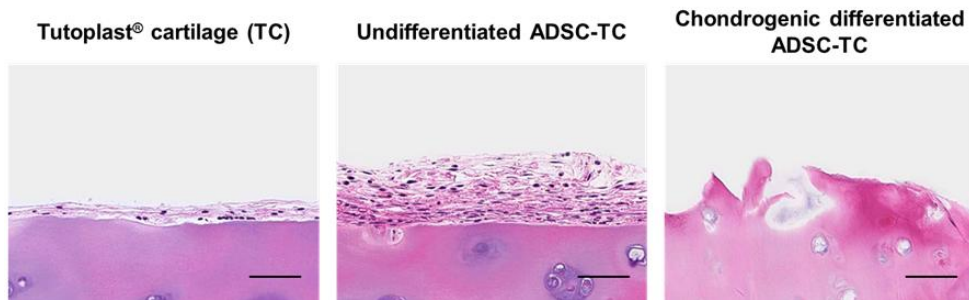


Figure 15. Images of hematoxylin & eosin (H&E) staining of Tutoplast® cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC at postoperative week 4. Scale bars = 50 μ m.

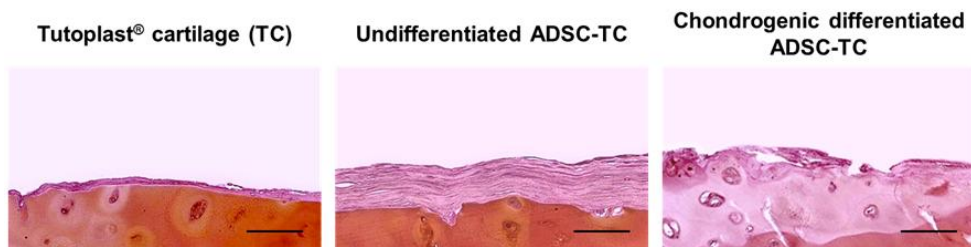


Figure 16. Images of Safranin O staining of Tutoplast[®] cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC at postoperative week 4. Scale bars = 50 μ m.

지만 미분화 연골군과 유의한 차이를 보이지 않았다. *COL10A1*과 *ACAN*은 세군 모두 유의한 차이 없이 비슷한 발현 정도를 보였다.

수술 4주 후 채취한 조직에 대해서 *COL1A2*의 발현은 분화 연골군에서 가장 높았으며 대조군과의 차이는 유의하였다 (Fig. 18). *COL2A1*은 미분화 연골군과 분화 연골군의 발현이 대조군에 비해 월등히 높았으며 이는 통계학적으로 유의하였다. *COL10A1*과 *ACAN*은 분화 연골군의 발현이 나머지 두군에 비해 유의하게 높았으며 미분화 연골의 발현도 대조군에 비해 유의하게 높았다.

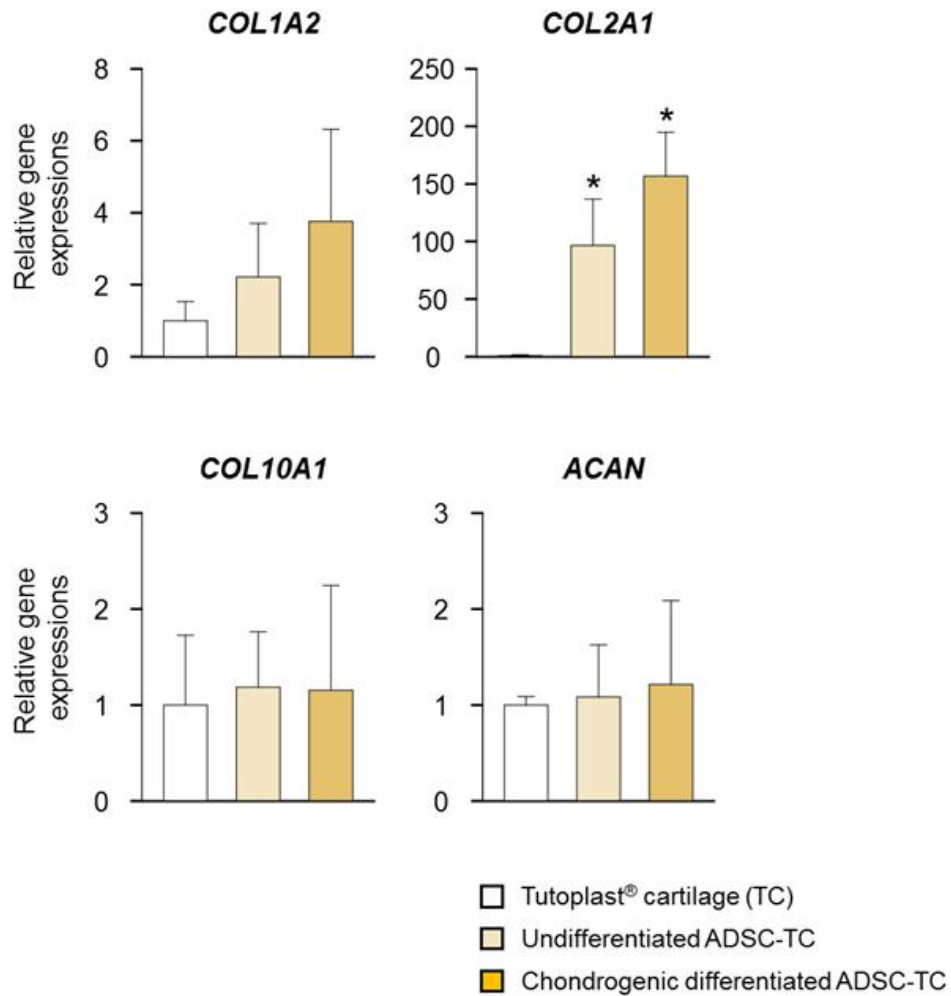


Figure 17. Quantitative real-time PCR analysis of *COL1A2*, *COL2A1*, *COL10A1* and *ACAN* at postoperative week 2 among Tutoplast® cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC. $n = 5$ per group. *, $p < 0.05$ versus Tutoplast® cartilage group.

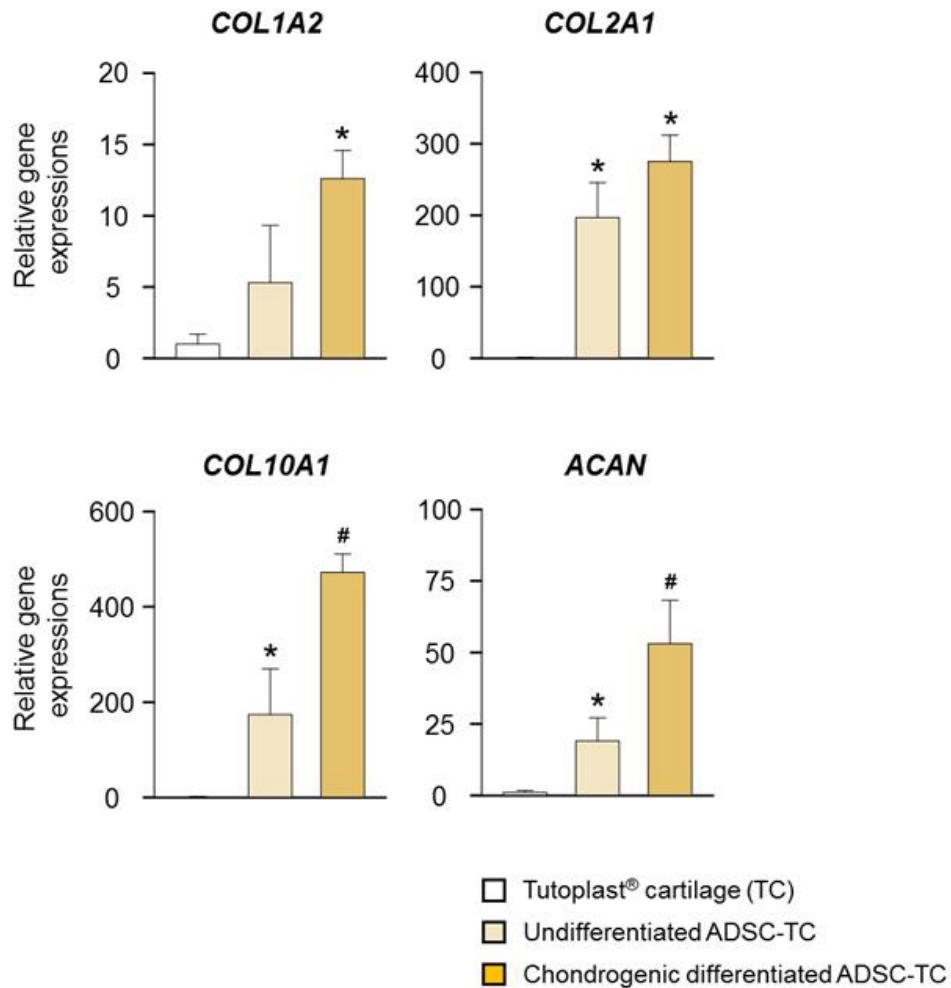


Figure 18. Quantitative real-time PCR analysis of *COL1A2*, *COL2A1*, *COL10A1* and *ACAN* at postoperative week 4 among Tutoplast® cartilage (TC), undifferentiated adipose-derived stem cell on TC (ADSC-TC) and chondrogenic differentiated ADSC-TC. $n = 5$ per group. *, $p < 0.05$ versus Tutoplast® cartilage group. #, $p < 0.05$ versus both Tutoplast® cartilage and undifferentiated ADSC-TC groups.

고찰

이번 연구에서 Tutoplast[®] 연골이 스캐폴드로서 지방유래 줄기세포의 생착이 가능한지 그리고 생착된 지방유래 줄기세포가 연골로 분화가 가능한 지 확인하였다. 이를 위해 인체에서 획득한 지방유래 줄기세포를 *in vitro* 환경에서 2차원적 및 3차원적 배양을 통해 연골세포로의 분화 과정을 확립하였다. 이어서 Tutoplast[®] 연골에 지방유래 줄기세포가 생착될 수 있는 조직인지 전자현미경을 통해 확인하였고, 궁극적으로 지방유래 줄기세포가 처리된 Tutoplast[®] 연골을 실험동물에 이식하였을 때 관찰기간동안 줄기세포가 유지되었을 뿐만 아니라 연골세포로 분화시킨 지방유래 줄기세포가 Tutoplast[®] 연골과 통합되어있음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 Tutoplast[®] 연골에 지방유래 줄기세포를 처리하고 연골 신생을 유도하는 연구는 이번이 처음이다.

중간엽줄기세포는 연골세포뿐만 아니라 근육세포, 지방세포, 혈관내피세포 등으로의 분화능이 있어 세포치료를 통한 재생의학의 주요 재료로서 각광받고 있다.²⁸ 지방유래 줄기세포는 중간엽줄기세포의 하나로서 지방조직의 결합조직 안에서 미세혈관에 둘러싸여 분포하고 있다.²⁹ 지방조직은 피하층에 풍부하게 존재하므로 지방유래 줄기세포는 손쉽게 상당한 양을 획득할 수 있어 같은 중간엽줄기세포인 골수유래 줄기세포보다 선호도가 높다. 따라서 연골의 재생에 있어 중간엽줄기세포로서 지방유래 줄기세포를 이용하는 연구는 다양하게 이뤄지고 있다.³⁰

현재로서는 정형외과 영역에서 골관절염과 관련하여 연골재생을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 연골은 조직 내 혈관밀도가 낮아 손상 시 주변으로부터 연골전구세포나 연골세포가 이동해오는데 한계

가 있기 때문에 내재적인 재생능력이 낮다. 이로 인해 자가연골세포를 직접 이식하는 시도가 있었지만, 공여부 연골이 필요하고, 이식된 연골세포가 미분화되는 한계를 보여 지금은 시행하고 있지 않다.^{31,32} 대안으로 연골세포로의 분화능을 가진 지방유래 줄기세포를 이용하여 관절연골의 재생을 꾀하고 있으며 좋은 결과를 보고한 연구가 다수 존재한다.³⁰

이번 연구는 넓은 의미에서 연골재생과 맥락을 같이 한다. 방사선 처리된 동종 늑연골은 면역성을 상실하였기 때문에 연골의 물리적 성상을 지닌 이식물질로 간주할 수 있는데, 늑연골에 처리한 지방유래 줄기세포가 연골 신생 media에 의해 연골세포로 분화되어 이식 후 실험동물 체내에서 유지되고 있었기 때문이다. Safranin O 염색으로 구분이 되었지만 새롭게 분화된 연골층이 기존의 동종 늑연골과 H&E 염색으로 구분되지 않을 정도로 통합되어있는 점은 특기할만하다. 하지만 Safranin O 염색으로 구분된 두 연골층이 기존의 동종 늑연골과 신생 연골이 맞는지, 염색으로 구분되는 원리는 무엇인지에 대한 후속 연구가 필요하다.

이번에 사용한 Tutoplast[®] 연골은 정상 연골과 마찬가지로 연골세포, 수분, 프로테오글라이칸 등으로 동일하게 구성되어 있다.³³ 제조과정에서 삼투, 산화, 용제 처리 및 감마선조사를 통해 각종 병원균과 바이러스 등을 제거하여 감염성 질환으로부터 안전성을 확보하는 한편, 연골세포의 표면에 발현하는 구조적합성 제1급 항원을 약화시켰다.¹¹ 하지만 수술 중 Tutoplast[®] 연골을 조각하는 과정에서 노출되는 내부 구조물과 연골 파편들이 비록 강도는 약하더라도 면역거부반응을 일으킬 수는 있다. 따라서 Tutoplast[®] 연골 표면에 이식 처리된 지방유래 줄기세포 및 줄기세포에서 분화된 연골세포는 Tutoplast[®] 연

골의 표면 노출을 줄여 면역거부반응의 발생 가능성을 낮추는 부수적인 효과도 얻게 되었다고 생각할 수 있다.

이번 연구의 임상적 가치는 환자의 체지방에서 획득한 지방유래 줄기세포를 이식할 동종 늑연골에 처리하여 연골 신생을 유도한 후 원하는 부위에 이식함으로써 동종 늑연골이 가진 단점과 한계를 극복할 수 있다는 점이다. 만약 자가 지방유래 줄기세포가 아닌 동종 지방유래 줄기세포를 적용하여 유사한 결과를 얻게 된다면 연구의 임상적 가치는 더욱 높아진다. 지방유래 줄기세포는 면역성이 매우 낮아 면역거부반응을 일으키지 않으며, 이와 함께 면역억제효과를 보인다는 연구들이 있는데 자가³⁴ 혹은 동종^{35,36} 줄기세포뿐만 아니라 이종³⁷ 줄기세포도 비슷한 효과를 보인다는 점이 흥미롭다. 따라서 건강한 기증자로부터 획득한 지방유래 줄기세포를 동종 늑연골에 처리하여 연골세포로 분화시킨 후 다른 환자에게 이식하는 방법도 이론적으로는 가능하다. 하지만 현행법상 기질혈관분획이 아닌 지방유래 줄기세포를 이식하는 것은 법률에 위배되기 때문에 현재로서는 임상에 적용하는 것은 불가능하다.

이번 연구에서 동종 늑연골에 처리한 지방유래 줄기세포가 추후 연골세포로 분화하는 것에 대해 전자현미경으로 세포의 형태를 관찰하고, 조직학적 소견과 연골 특이 유전자인 *COL1A2*, *COL2A1*, *COL10A1* 및 *ACAN*의 발현을 분석하였다.^{27,38} 이전 연구들에서 연골 특이 유전자로 알려져 있는 다수의 유전자 중에서 흔히 사용되는 것들로 선택하였으며, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL10A1* 및 *ACAN*, 이 네 가지 유전자의 발현 양상이 유사하게 나타난 점을 통해 이번 연구 결과의 신뢰도를 높일 수 있었다.

한편 연골 신생 media 하에서 2주간의 배양을 통해 지방유래 줄기

세포의 일부가 연골세포로 분화된 것을 관찰하였고, 이식 4주 후 신생 연골이 유지됨을 확인할 수 있었다. 실험동물을 이용한 이식술시 세 가지 군으로 나누어 실험을 진행하였는데, 2군의 미분화 연골군에서 조직학적 소견상 동종 늑연골 표면에 두꺼운 세포층이 관찰되었으나, 유전자발현 분석에서 연골 특이적 유전자발현이 3군인 분화 연골군에 못지않게 통계학적으로 유의하게 높았던 점은 예상치 못한 결과였다. 이는 비록 면역성이 사라진 동종 늑연골이라 하더라도 동종 늑연골이 조성하는 체내 환경이 연골 특이적 유전자발현 및 이로 인한 연골로의 분화에 영향을 미쳤다고 볼 수 있다. 하지만 1군인 대조군에서는 연골 특이적 유전자발현이 거의 없었던 점을 볼 때 섬유모세포에 없는 지방유래 줄기세포의 연골분화능이 1군과 2군의 결과에 차이를 보인 것이라 추정할 수 있다. 따라서 지방유래 줄기세포는 방사선 처리된 동종 늑연골 표면에서 연골 신생의 유전자가 발현될 수 있으나 실제로 연골로 분화하기 위해서는 연골 신생 media와 같은 외부 자극이 필요하다고 결론지을 수 있다.

이번 연구는 몇 가지 한계를 가지고 있어 이를 보완하기 위한 후속연구가 필요하다. 첫째, 지방유래 줄기세포를 처리한 동종 늑연골을 이식한 후 관찰 기간이 4주 밖에 되지 않았다. 누드마우스와 인체의 환경이 다르지만, 동종 늑연골에 대한 임상논문 중 추적기간이 길었던 논문에서 합병증의 비율이 높았던 점을 고려하였을 때 추후 연구에서 4주 이상의 장기 추적시 안정적 사용에 대한 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 있으리라 판단된다. 둘째, 지방유래 줄기세포 처리가 동종 늑연골의 물리적 성상에 미친 영향에 대한 평가가 부족했다. 비록 분주한 지방유래 줄기세포와 분화로 인해 신생된 연골이 기존의 동종 늑연골 표면에 위치하였지만 배양과정이나 신생 연골이 동종 늑연골

의 강도나 유연성에 변화를 일으켰는지에 대한 확인은 후속 연구에서 필요하다고 할 수 있다. 셋째, 궁극적으로 동종 늑연골에 처리한 자가 지방유래 줄기세포가 인체 내로 이식되었을 때 수혜부 조직과의 자연스러운 유착에 어떠한 영향을 미치는지 확인되어야 한다. 인체유래 줄기세포를 체내에 이식하는 행위는 현행법상 불가능하다. 따라서 마우스와 같은 실험동물에서 획득한 지방유래 줄기세포로 동종 늑연골을 처리하고 실험동물에 이식함으로써 동종 늑연골이 가지고 있는 문제점이 해결될 수 있는지 간접적으로 확인할 수 있겠다.

결론

이번 연구에서 인체에서 얻은 지방유래 줄기세포를 *in vitro* 환경에서 2차원적 및 3차원적으로 배양과 연골세포로의 분화를 거쳐 성공적으로 연골세포를 만들어 낼 수 있었다. 확립된 배양방법을 이용하여 방사선 처리된 동종 늑연골인 Tutoplast® 연골에 지방유래 줄기세포를 분주하여 연골의 표면에 유착됨을 전자현미경 소견으로 확인하였다. 뿐만 아니라 유착된 지방유래 줄기세포가 연골 신생 media 하에서 연골세포로 분화함을 확인하였다. 연골 신생이 일어난 동종 늑연골을 실험동물의 피하에 이식하여 2, 4주후 관찰한 결과 Tutoplast® 연골 표면에 유착된 신생 연골은 관찰 기간 동안 신생 연골이 유지되었을 뿐만 아니라 기존의 Tutoplast® 연골에 통합되어있음을 확인할 수 있었다. 따라서 연골이 필요한 치료에 있어서 방사선 처리된 동종 늑연골을 보다 안정적으로 사용할 수 있는 실험적 근거를 제공하였는데 이번 연구에 의의가 있다고 할 수 있겠다.

참고문헌

1. North JF. The use of preserved bovine cartilage in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 1953;11(4):261-274.
2. Grobbelaar AO, Matti BA, Nicolle FV. Donor site morbidity post-conchal cartilage grafting. *Aesthetic Plast Surg* 1997;21(2):90-92.
3. Bateman N, Jones NS. Retrospective review of augmentation rhinoplasties using autologous cartilage grafts. *J Laryngol Otol* 2000;114(7):514-518.
4. Skouteris CA, Sotereanos GC. Donor site morbidity following harvesting of autogenous rib grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 1989;47(8):808-812.
5. Thomson HG, Kim TY, Ein SH. Residual problems in chest donor sites after microtia reconstruction: a long-term study. *Plast Reconstr Surg* 1995;95(6):961-968.
6. O'Connor GB. Refrigerated Cartilage Isografts: Their Source, Storage, and Use. *Cal West Med* 1940;52(1):21-23.
7. Straith CL, Slaughter WB. Grafts of preserved cartilage in restorations of facial contour. *JAMA* 1941;116(18):2008-2013.

8. Dingman RO, Grabb WC. Costal cartilage homografts preserved by irradiation. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 1961;28(5):562-567.
9. Kridel RWH, Kraus WM. Grafts and implants in revision rhinoplasty. *Facial Plast Surg Clin North Am* 1995;3:473-486.
10. Kridel RW, Ashoori F, Liu ES, Hart CG. Long-term use and follow-up of irradiated homologous costal cartilage grafts in the nose. *Arch Facial Plast Surg* 2009;11(6):378-394.
11. Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Class II antigenicity of human cartilage: relevance to the use of homologous cartilage graft for reconstructive surgery. *Ann Plast Surg* 1991;26(6):541-543.
12. Donald PJ, Deckard-Janatpour K, Sharkey N, Lagunas-Solar M. The effects of irradiation dose on the stiffness of cartilage grafts. *Ann Plast Surg* 1996;36(3):297-303.
13. Schuller DE, Bardach J, Krause CJ. Irradiated homologous costal cartilage for facial contour restoration. *Arch Otolaryngol* 1977;103(1):12-15.
14. Kridel RW, Konior RJ. Irradiated cartilage grafts in the nose. A

preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119(1):24-30; discussion 30-31.

15. Lefkovits G. Nasal reconstruction with irradiated homograft costal cartilage. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(4):1291-1292; author reply 1292.

16. Demirkan F, Arslan E, Unal S, Aksoy A. Irradiated homologous costal cartilage: versatile grafting material for rhinoplasty. *Aesthetic Plast Surg* 2003;27(3):213-220.

17. Tosun Z, Karabekmez FE, Keskin M, Duymaz A, Savaci N. Allogeneous cartilage graft versus autogenous cartilage graft in augmentation rhinoplasty: a decade of clinical experience. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32(2):252-260; discussion 261.

18. Song HM, Lee BJ, Jang YJ. Processed costal cartilage homograft in rhinoplasty: the Asan Medical Center experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134(5):485-489.

19. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008;29(15):2378-2387.

20. Cheng NC, Estes BT, Awad HA, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A* 2009;15(2):231-241.
21. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-228.
22. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-4295.
23. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010;5(7):1294-1311.
24. Baptista LS, Silva KR, Pedrosa CS, Amaral RJ, Belizario JV, Borojevic R, et al. Bioengineered cartilage in a scaffold-free method by human cartilage-derived progenitor cells: a comparison with human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Artif Organs* 2013;37(12):1068-1075.
25. Stromps JP, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J,

Pallua N. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management? *Biomed Res Int* 2014;2014:740926.

26. Jin CZ, Cho JH, Choi BH, Wang LM, Kim MS, Park SR, et al. The maturity of tissue-engineered cartilage in vitro affects the repairability for osteochondral defect. *Tissue Eng Part A* 2011;17(23-24):3057-3065.

27. Tang C, Jin C, Xu Y, Wei B, Wang L. Chondrogenic Differentiation Could Be Induced by Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Matrix Scaffolds Without Exogenous Growth Factor. *Tissue Eng Part A* 2016;22(3-4):222-232.

28. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9(1):11-15.

29. Minteer DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin Plast Surg* 2015;42(2):169-179.

30. Im GI. Regeneration of articular cartilage using adipose stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(7):1830-1844.

31. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-895.
32. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, et al. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury* 2010;41(11):1196-1203.
33. Suh MK, Ahn ES, Kim HR, Dhong ES. A 2-year follow-up of irradiated homologous costal cartilage used as a septal extension graft for the correction of contracted nose in Asians. *Ann Plast Surg* 2013;71(1):45-49.
34. Gong L, Zhou X, Wu Y, Zhang Y, Wang C, Zhou H, et al. Proteomic analysis profile of engineered articular cartilage with chondrogenic differentiated adipose tissue-derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh for weight-bearing area defect repair. *Tissue Eng Part A* 2014;20(3-4):575-587.
35. Zhang HN, Li L, Leng P, Wang YZ, Lv CY. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage. *Chin J Traumatol* 2009;12(2):92-97.

36. Wang ZJ, An RZ, Zhao JY, Zhang Q, Yang J, Wang JB, et al. Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits. *Genet Mol Res* 2014;13(2):4599-4606.
37. Van Pham P, Bui KH, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(4):91-101.
38. Ye K, Traianedes K, Choong PF, Myers DE. Chondrogenesis of Human Infrapatellar Fat Pad Stem Cells on Acellular Dermal Matrix. *Front Surg* 2016;3:3.

Abstract

The effect of chondrocytes differentiated from adipose-derived stem cells on the irradiated cartilage

Soon Woo Choi

Department of Medicine
Plastic Surgery Major
The Graduate School
Seoul National University

Background

Rhinoplasty has gained a popularity as one of the aesthetic surgery. In Asian countries, graft implantation to nasal dorsum and tip is often conducted. In a patient with a difficulty having enough autologous cartilage, irradiated allogeneic costal cartilage (IACC) can be an alternative option. However, complications such as infection, absorption, and warping can occur during long-term follow-up. This study aims to explore the Tutoplast® cartilage (TC) which is one of commercial IACC associated with compatibility as a scaffold for adipose-derived stem cells (ADSCs), maintenance of chondrogenic differentiated ADSCs after transplantation, and postoperative complications.

Methods

Human ADSCs were cultured and differentiated to chondrocytes in *in vitro* setting. Then, ADSCs which were seeded on TC were observed by scanning electron microscope (SEM), and differentiated to chondrocytes. Three kinds of TC including TC itself, undifferentiated ADSC-TC, and chondrogenic differentiated ADSC-TC were transplanted in the subcutaneous plane of flank of nude mice. At postoperative week 2 and 4, TC was harvested and

performed with gross, histological, and gene expression analyses. Modified International Cartilage Research Society scoring system was used for qualitative analysis of cartilage.

Results

By 2- and 3-dimensional culture, ADSCs were differentiated to chondrocytes which were positive in Alcian blue staining and expressed *COL2A1* gene. ADSCs seeded on TC were differentiated to chondrocytes under the chondrogenic media confirmed by SEM. Among 3 kinds of TC transplanted to nude mice, chondrogenic differentiated ADSC-TC showed the maintenance of newly differentiated cartilage by gross and histological analyses, and higher expressions of cartilage-specific genes than other groups. After transplantation, there was no postoperative complication such as wound infection, cartilage exposure, and animal death.

Conclusions

TC can be a scaffold of ADSCs. Newly differentiated cartilage was maintained after transplantation to nude mice. Thus, this study provides experimental evidences for stable use of IACC in the treatment requiring the cartilage.

Keywords: rhinoplasty, allografts, stem cells, chondrogenesis
Student Number: 2011-30581